

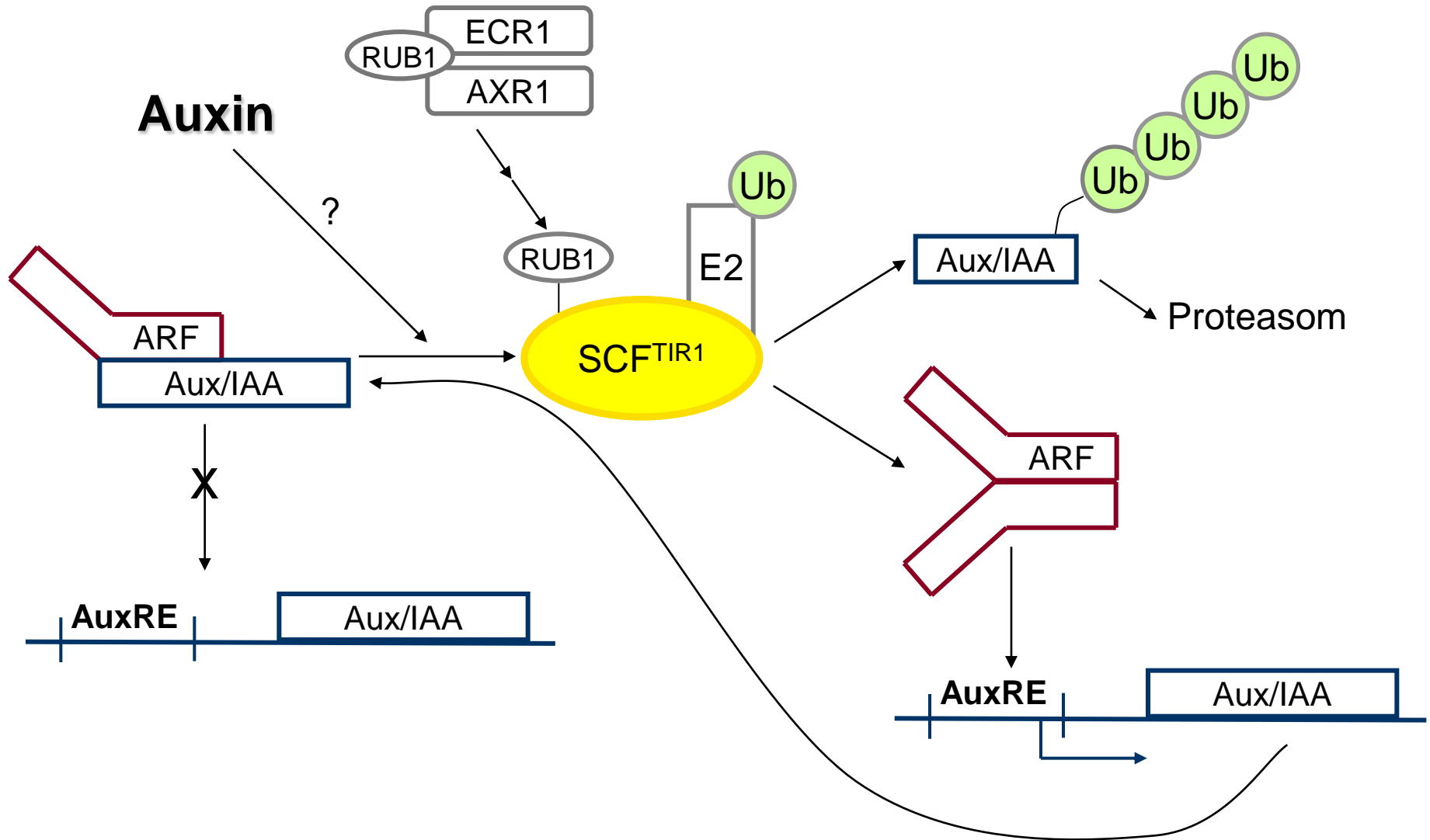
The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo

Thorsten Hamann, Ulrike Mayer and Gerd Jürgens

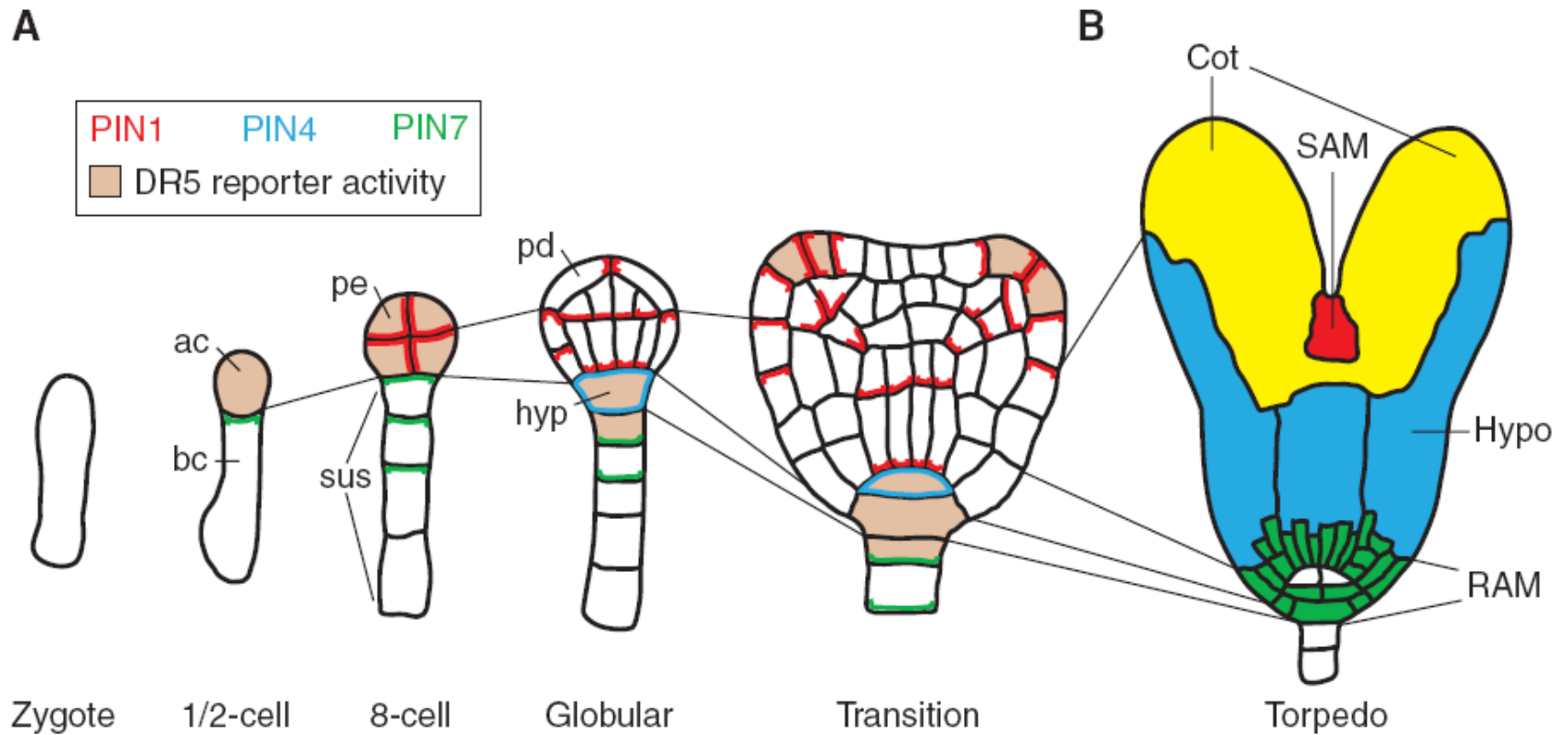
The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning

Thorsten Hamann, Eva Benkova, Isabel Bäurle, Marika Kientz and Gerd Jürgens

Modell



Embryogenese



bodenlos-Phänotyp vs. *monopteros*- Phänotyp



bodenlos-Mutante



monopteros-Mutante

bodenlos-Phänotyp

WT:

Beiden äußeren: *bdl*,
schwacher Phänotyp

Die beiden inneren: *bdl*,
starker Phänotyp



Bei Dunkelheit:

axr1 (links)

bdl (mittig)

WT (rechts)

Auf 2,4-D:

bdl (links)

WT (mittig)

axr1 (rechts)



Kallus

induziertes

Medium:

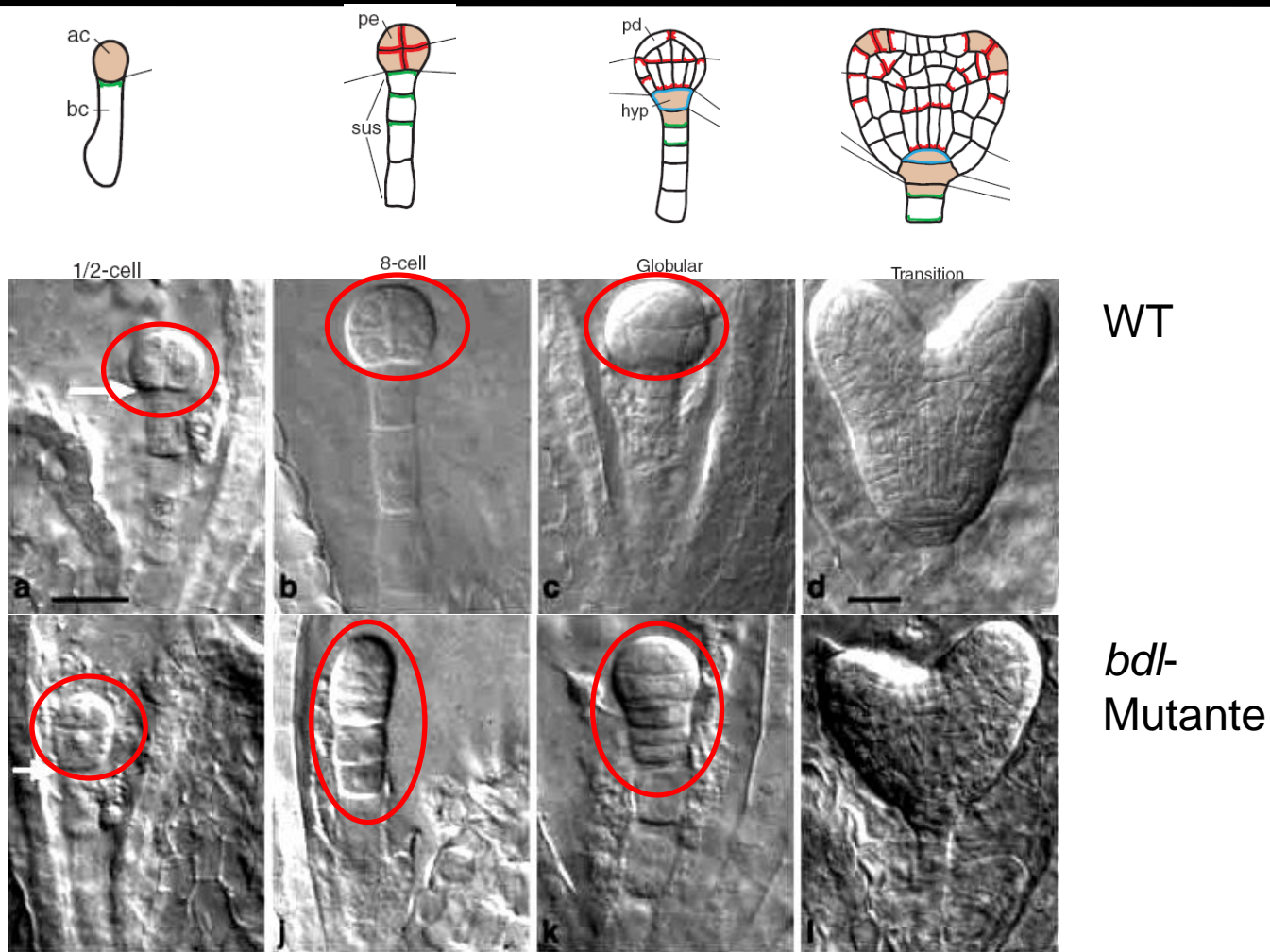
bdl (links)

WT (mittig)

axr1 (rechts)

bdl zeigt ähnliche Reaktionen wie *axr1* und ist ebenfalls resistent gegenüber Auxin

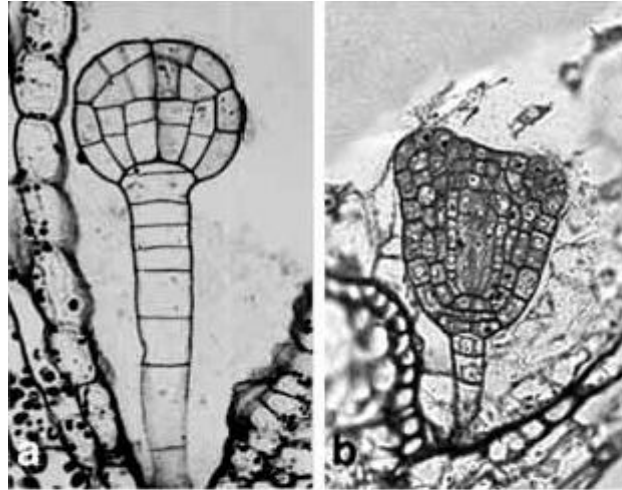
Ergebnisse des ersten Papers



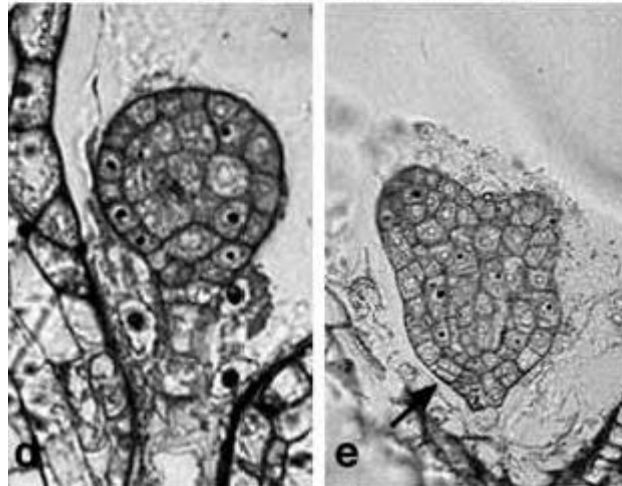
Zweizell-Stadium: statt vertikale horizontale Teilung

Ergebnisse des ersten Papers

Kein
Hypophysen-
Teilung im
Herzstadium,
aber ähnlichen
Phänotyp im
Torpedostadium



WT



bdl- Mutante

Kugelstadium

Herzstadium

The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS- mediated embryo patterning

Thorsten Haman, Eva Benkova, Isabel
Bäurle, Marika Kientz and Gerd Jürgens

Ziele

- Charakterisierung des *BDL*- Gens
- Lokalisierung des BDL Proteins in der Zelle
- Interaktion mit ARF Proteinen
- Zeitliche und räumliche Expression von *BDL* und *MP*
- Promotor-Aktivität

Überblick der Proteinfamilien IAA und ARF in *Arabidopsis thaliana*

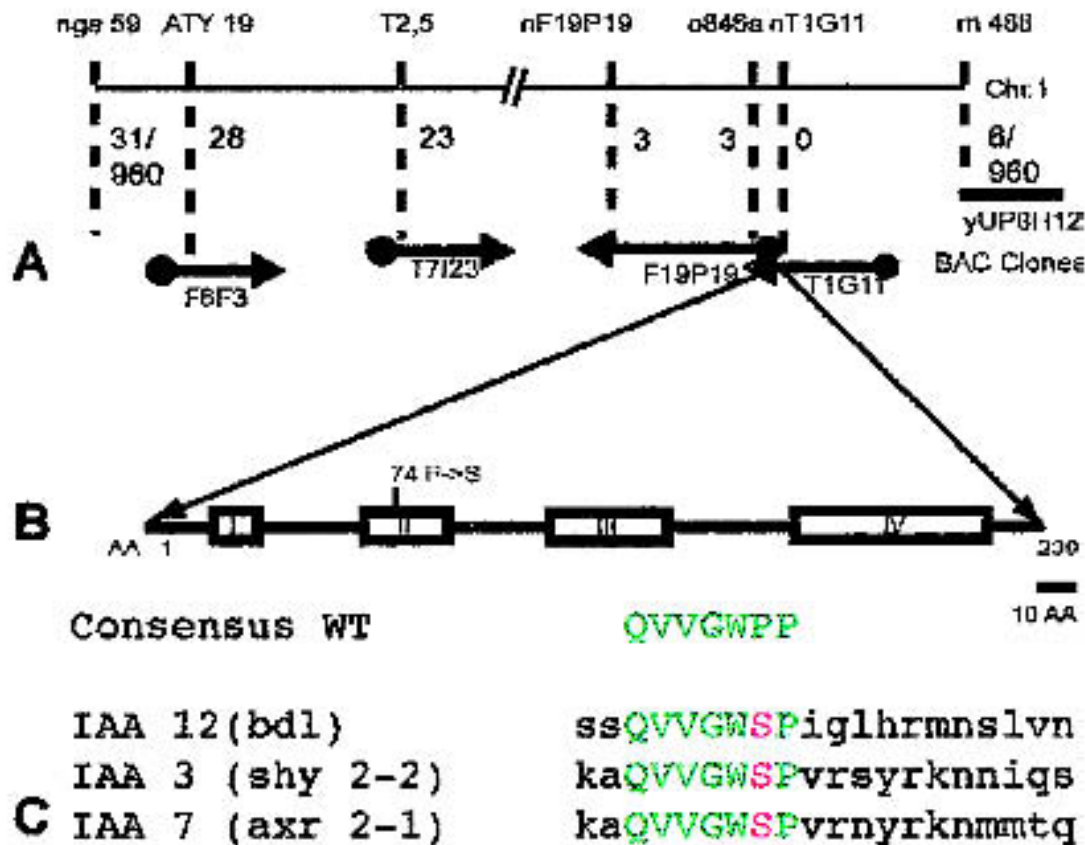
ca. 28 IAA-Proteine

Neue Nomenklatur	Alte Nomenklatur
IAA3	shy2-2
IAA7	axr2-1
IAA12	bdl
IAA14	slr-1
IAA17	axr3-1
IAA19	msg2-1
IAA28	iar2-1

ca. 23 ARF-Transkriptionsfaktoren

Neue Nomenklatur	Alte Nomenklatur
ARF3	ETT
ARF5	MP
ARF7	NPH4

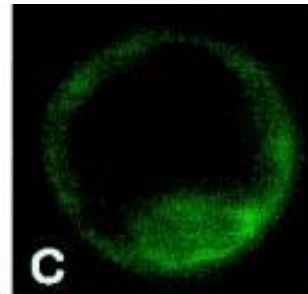
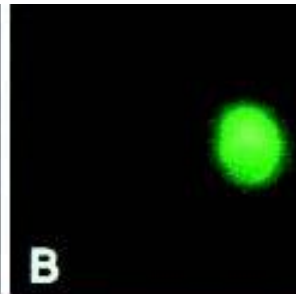
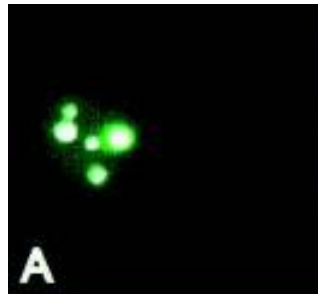
Charakterisierung des *BDL*-Gens



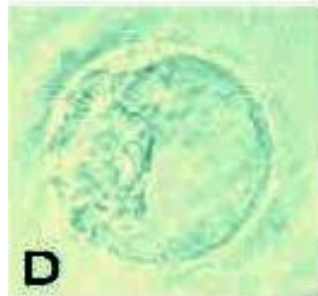
- 4 Domänen wie IAA-Proteine
- AS-Austausch in *bdl*-Mutante:
Pro (74) -> Ser
- Mutation in Domäne II von *IAA12* (*bdl*)
- Identische Mutation bei *IAA3* und *IAA7*

bdl-Protein kann durch SCF^{TIR1}-Komplex nicht abgebaut werden
→ gain-of-function- Mutation

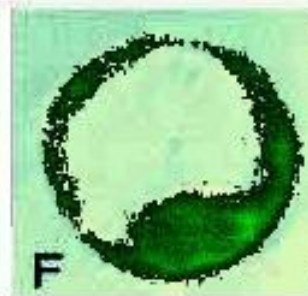
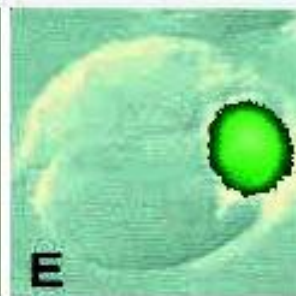
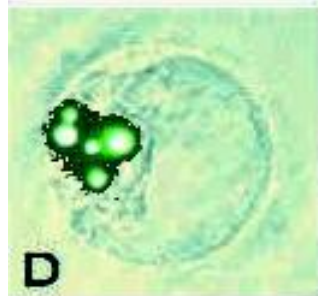
Lokalisierung von BDL in der Zelle



GFP-Floureszenz-
Mikroskopie



Lichtmikroskopie



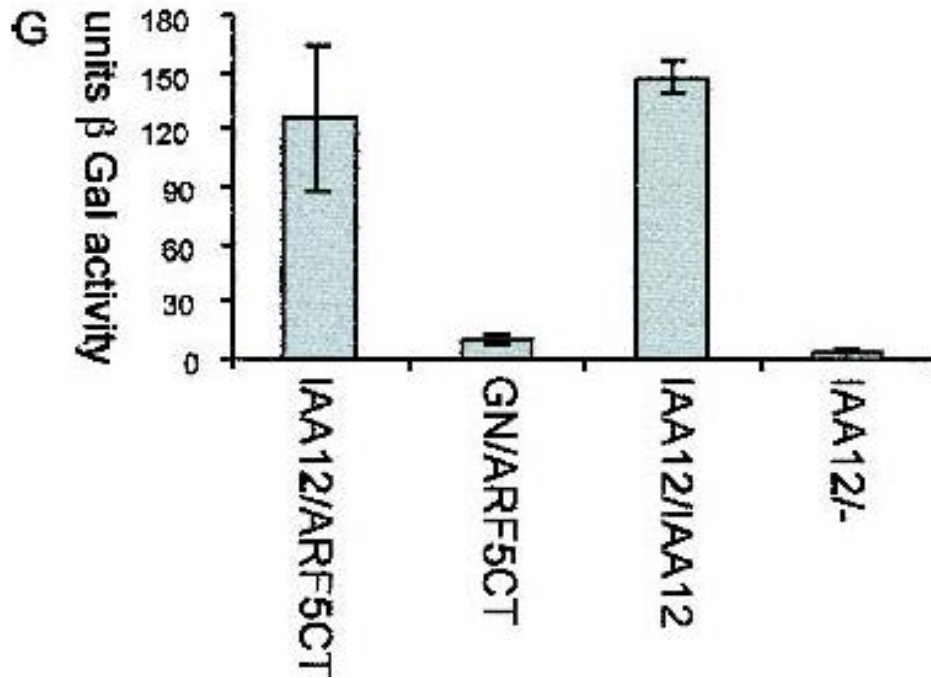
BDL kommt
kompartimentiert im
Zellkern vor.

BDL-GFP:
nuclear
spekles

GFP-NLS

GFP mit
nuclear
export signal

Interaktion von BDL-Protein in Hefezellen



- Untersuchung im yeast-2-hybrid-System mit β -Gal-Reporter
- Interaktion von BDL mit Domäne III und IV von MP
- GNOM bindet nicht am C-Terminus von MP
- Interaktion von BDL mit sich selbst

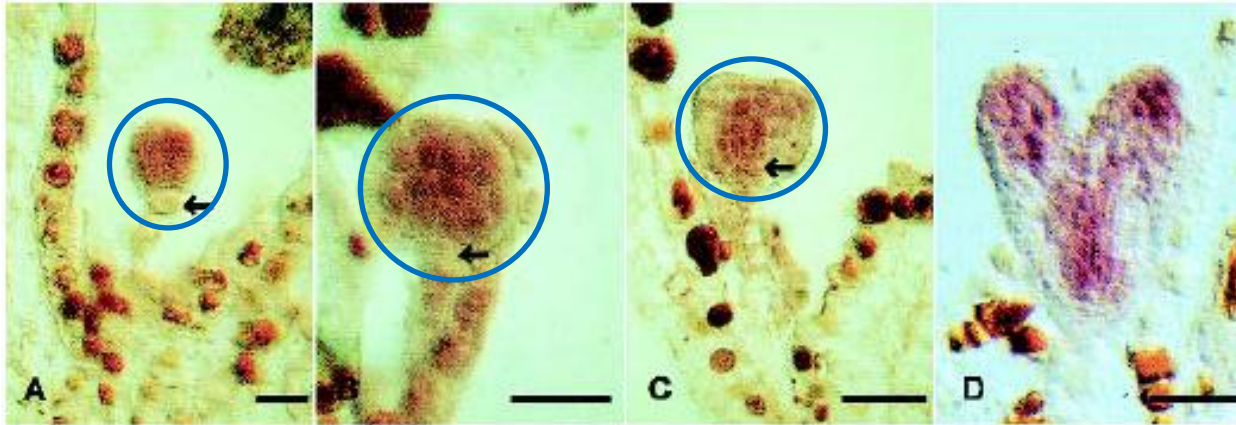
BDL interagiert mit sich selbst und mit MP über die Domänen III und IV.

in-situ-Hybridisierung

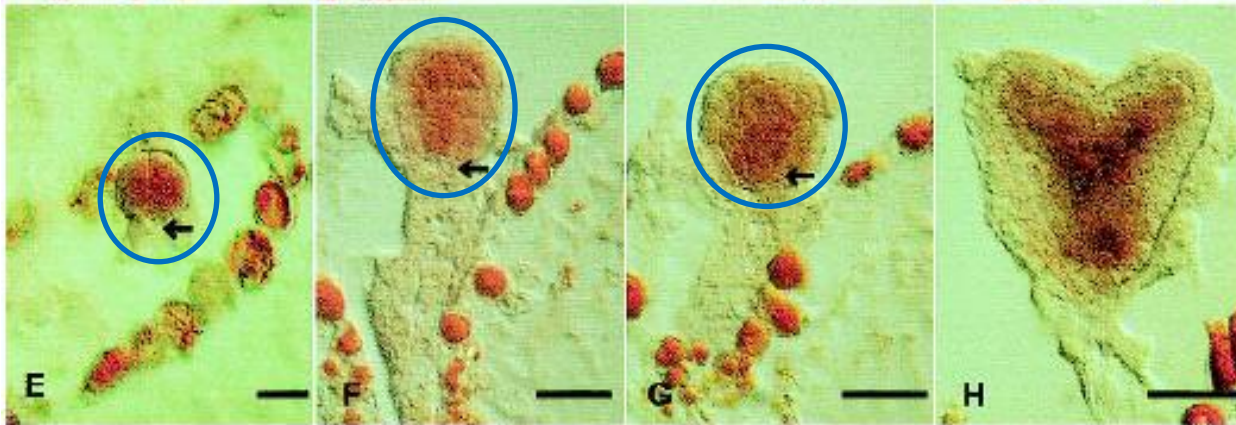
- *BDL*-komplementäre (antisense) Sequenz in markierter mRNA = Sonde
- Sonde bindet an mRNA in der Zelle
- Färbung an den Stellen an denen *BDL*-mRNA vorhanden ist

mRNA in-situ-Expressionsanalyse von BDL und MP

BDL



MP

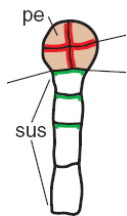


„→“ Hypophyse in A, B, E, F

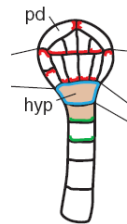
„→“ linsenförmige Zellen in C, G

-MP und BDL werden im gleichen Gewebe zum gleichen Zeitpunkt exprimiert (Apikalzellen und linsenförmige Zellen)

→ Interaktion möglich

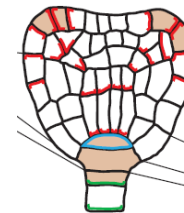


8-cell



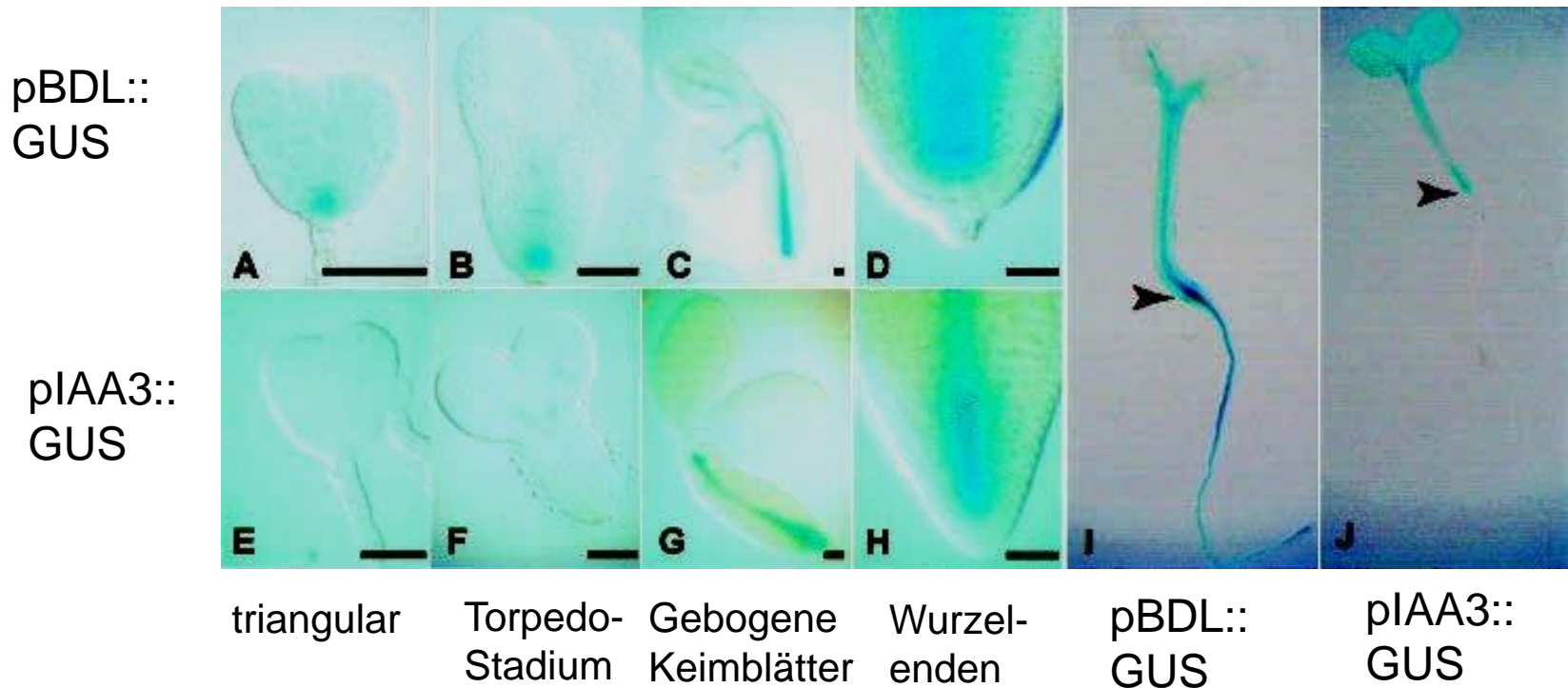
Globular

Globuläres Stadium mit linsenförmigen Zellen



Transition

Promotoraktivität



- GUS mit pBDL wird in allen Stadien exprimiert (Expression v. a. in Wurzel)

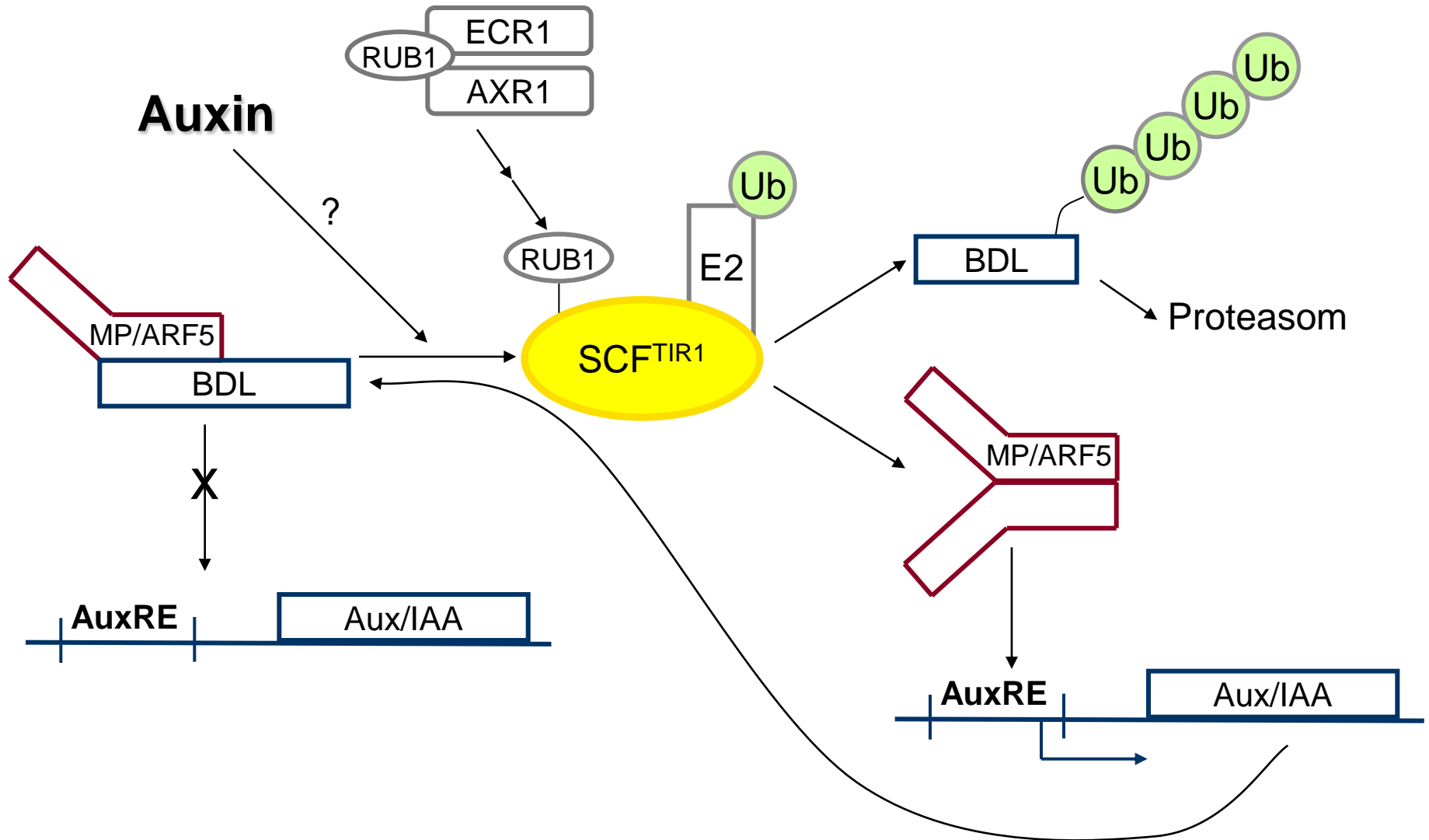
- GUS mit pIAA3 erst in späteren Stadien und in anderen Geweben (Keimblätter, nicht in der Wurzel) exprimiert

→ Spezifität der AUX/IAA Proteine durch Expression in unterschiedlichen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten (transkriptionelle Regulation)

Zusammenfassung

- bdl kann nicht durch den SCF^{TIR1}-Komplex abgebaut werden
→ *bdl*-Mutation ist Auxin-resistent
- BDL ist wie MP im Zellkern lokalisiert und wird zur gleichen Zeit exprimiert.
- BDL und MP können miteinander interagieren
- IAA3 und BDL werden zu unterschiedlicher Zeit in verschiedenen Geweben exprimiert

Modell



verbleibende Probleme

- Welches IAA interagiert mit welchem ARF?
- Auslöser für Interaktion untereinander und mit SCF-Komplex?
- Auxinrezeptor?